

札幌市における下水からのウイルス分離

秋 葉 澄 伯*

放射線影響研究所 (理事長 重松逸造 博士)

浦 沢 价 子

札幌医科大学衛生学講座 (主任 浦沢正三 教授)

田 中 裕 士** 細 谷 静 恵**

Isolation of Viruses from Sewage in Sapporo

Suminori AKIBA*

Radiation Effects Research Foundation

(Chairman : Dr. I. Shigematsu)

Tomoko URASAWA

Department of Hygiene, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. Urasawa)

Hiroshi TANAKA and Shizue HOSOYA**

Samples of waste water were collected from a sewage plant in Sapporo between July, 1980 and July, 1981 at one month intervals and isolation of viruses was attempted using HeLa cells and RD cells. The results were as follows:

1) From the summer to winter of 1980 many strains of Coxsackie B3 virus and echo 3 virus were isolated. The former virus was isolated as frequently in the fall as in the summer.

2) Many strains of type 2 and 3 poliovirus were isolated in the spring and fall, and these were considered to be live attenuated viruses. The possibility of the strain isolated in June being a wild strain however, cannot be denied.

3) While the frequency of virus isolation from sewage decreased during the winter period, echo 25 virus was isolated every month from January to March, 1981.

4) The results of virus isolation from sewage in Sapporo agree well with those in other areas of Japan which are mainly based on the results of tests on material directly obtained from patients. Therefore, periodical isolation trials of virus from sewage should be considered to be a useful method in the surveillance of enterovirus. (Received April 11, 1983 and accepted June 8, 1983)

Key words: Waste water, Virus, Isolation

1 結 言

都市下水には水洗便所を介して大量の尿が流れ込んでおり、このウイルス学的検索を行えば、下水排出地域に於ける腸管系ウイルス流行状況を不顕性感染

を含め把握できる可能性がある。最近、全国各地で下水、河川からのウイルス分離が試みられ¹⁻³⁾、enterovirus, adenovirus, reovirusなどの分離が報告されている。我々は札幌市白石区の下水処理場において昭和55年7月から翌年7月まで毎月、下水を採取し、そのウ

* 本研究は1980年から1981年にかけて著者が札幌医科大学衛生学講座在職中に行われた。

** 本学第4学年学生

ウイルス学的検索を行ったので報告する。

2 研究材料と方法

2.1 検体の採集および処理方法

札幌市白石区厚別下水処理場より、毎月、生下水、最初沈澱池からの汚水（初沈汚泥）を各々、滅菌タンポン、滅菌容器に採取し、 -20°C で保存した。なお、滅菌タンポンは生下水流入路に一昼夜放置後、回収し、生下水を絞り出して容器に移し替えた後、冷凍保存した。

この下水場を選んだ理由は、下水の排出地域に新興住宅地が多く、従って乳幼児が多いため、下水中に腸管系ウイルスを多数含んでいる可能性があること、大きな工場が少なく、ウイルス分離の障害となりうる工場排水の混入が少ないことなどである。

検体は、Wellings *et al.*⁴⁾の方法を参考にして Fig. 1 に示すように処理した。以下概略を述べる。

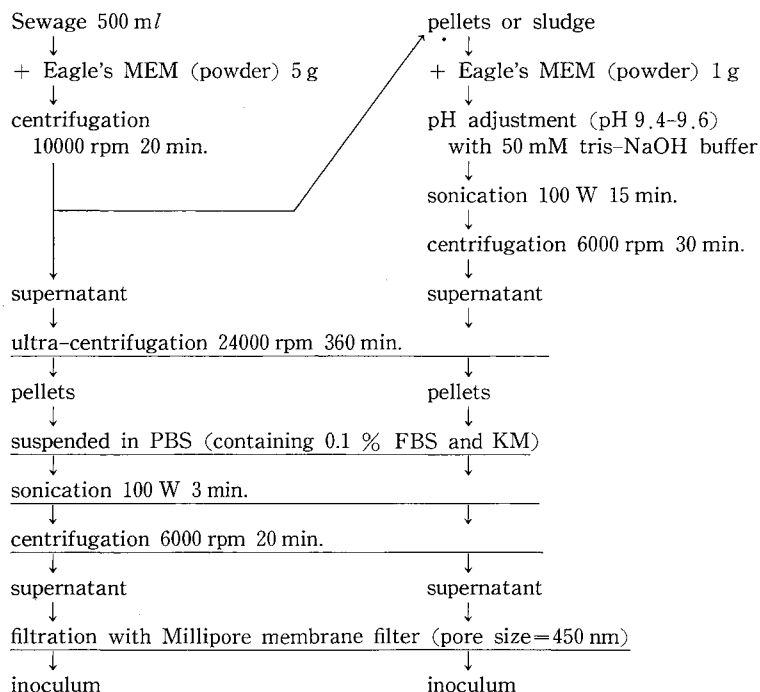
生下水は遠心 10,000 rpm, 20 min により上清と沈澱（生汚泥）に分け、上清は 24,000 rpm, 360 min (Hitachi: RPS-25 rotor) の超遠心により濃縮した。

一方、生汚泥は 50 mM Tris-NaOH buffer で pH 9.4-9.6 に調整後、sonication (100 W 30 min.) を行い、遠心 (10,000 rpm 20 min.) で沈澱を除き超遠心 (24,000 rpm, 360 min.) で濃縮した。超遠心後の沈澱はいずれも PBS (phosphate buffered saline; pH 7.4, 0.1% 胎児牛血清, Kanamycine を含む) で suspension とされ、結局、生下水は出発材料に対し約 100 倍、生汚泥は約 60 倍、初沈汚泥は約 50 倍に濃縮され、ミリポアフィルター（ポアサイズ 450 nm）で除菌後、細胞に接種した。

2.2 ウイルスの分離および同定

ウイルスの分離には HeLa 細胞、RD 細胞の monolayer を形成させた培養試験管を一検体当たり 4 本（各細胞当たり 2 本）用いた。細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) の観察は検体接種後一週間まで行い、2 代継代後も、CPE 陰性の検体をウイルス分離陰性とした。ウイルスの同定には Schmidt pool 血清^{5,6)}、Melnick pool 血清⁷⁾を用いたマイクロプレートによる中和試験を行った。

Fig. 1 Procedure of purification of Sample



PBS: Phosphate Buffered Saline

FBS: Fetal Bovine Serum

KM: Kanamycine

Table 1 Results of isolation of viruses from waste water in Sapporo

		Sewage				Sludge	
		supernatant		pellets			
		HeLa	RD	HeLa	RD	HeLa	RD
July	1980	P-3	E-3	P-1	CB-3	R-1	CB-3
August	"	E-3	E-3	E-3	E-13	E-3, CB-3	E-3, CB-3
September	"	E-7, CB-3	E-3, E-7	E-3, CB-3	E-7	E-3	E-3, E-7, CB-3
October	"	CB-3	E-3	CB-3	E-7	CB-3	E-7, P-3
November	"	CB-3	P-2	CB-3, P-2	P-2, P-3	P-3	P-1, P-3
December	"	CB-3	E-3, P-2	CB-3	E-3, P-2	CB-3	—
January	1981	—	E-25	CB-3	?	—	—
February	"	—	—	—	E-25	—	—
March	"	?	E-3	—	E-25	—	—
April	"	P	P-3	P-3	P-2	—	—
May	"	P-3	P-3	—	—	—	P-2
June	"	E-19, P	P	CB-3, P	P-2	—	—
July	"	E-19, P	P-3	P	P-2	ND	ND

E : Echo virus
— : not isolated

CB : Coxsackie B virus
? : untypable

P : Poliovirus
ND: not done

R : Reovirus

3 結 果

調査期間中のウイルス分離状況は Table 1 に示した通りである。Coxsackie B 3 型は昭和 55 年 7 月～56 年 1 月にかけて毎月分離されており、分離頻度もこの期間中差が無い。echo 3 型は 7 月～12 月まではほぼ毎月分離されているが、分離頻度は 7 月～9 月に多い。echo 7 型は 9, 10 月に分離されており、この時期には 3 つのウイルスによる混合流行があったと考えられる。55 年 1 月～3 月にかけてはウイルスの分離頻度は低くなるが、echo 25 型がこの間毎月分離されているのが注目される。Poliovirus は生ワクチンの接種時期(4 月および 10 月)に対応して 4 月～7 月および 10 月～12 月に多数分離されている。型別にみると 3 型, 2 型が多い。その他, reo 1 型, echo 19 型などのウイルスが散発的に分離されている。なお, 56 年 3 月生下水上清, 56 年 1 月生汚泥中に含まれ, 各々 HeLa 細胞, RD 細胞で分離されたウイルス 2 株は, Schmidt pool 血清および Melnick pool 血清では同定できなかった。いずれも高単位の抗ポリオウイルス抗血清存在下で増殖しうることから poliovirus ではないと思われる。

細胞の種類によるウイルスの分離頻度 (Table 2) をみると polio 2 型, echo 3 型, 7 型などは RD 細胞でよく分離され, Coxsackie B 3 型は HeLa 細胞で分離さ

れる率が高く, polio 3 型, 1 型では両方で差がみられなかった。

生下水および初沈汚泥からのウイルスの分離頻度は生下水に高く, 生下水の汚泥と上清両者間でウイルスの分離頻度に差は認められなかった。分離されるウイルスの種類も各月別にみるとやや差があるものの, 全体としては差がみられない。なお, 下水は各種処理を経て, 最終的に河川へ放出されるが, この放流直前の水について 55 年 7 月にウイルス分離を試みたが陰性であった。

Table 2 Results of isolation of viruses by HeLa cells and RD cells

	HeLa	RD
Coxsackie B 3	12	1
echo 3	4	9
echo 7	1	5
echo 13	0	1
echo 19	2	0
echo 25	0	3
polio 1	1	1
polio 2	1	7
polio 3	4	6
reo 1	1	0

4 考 察

著者らが本検索を行った時期には、厚生省による感染症サーベイランスは未だ実施されておらず、当時の札幌市におけるウイルス感染症、特に腸管系ウイルス感染症の流行状況は明らかでない。しかし、国立予防衛生研究所発行の病原微生物検出情報⁸⁾(以下、検出情報と略す)には各地の衛生研究所などで分離同定されたウイルスが記載されており、全国のウイルス感染症流行状況にある程度把握することが可能である。これによると我々の調査期間中、北海道では55年10月にCoxsackie A 16型ウイルスの分離が報告されているのみで、他の enterovirus, reovirus, adenovirus の分離は報告されていない。

検出情報によると Coxsackie B 3型は秋田などで55年7月をピークに秋まで多数分離されており、echo 3型も7月前後に京都、岐阜などで多数分離されている。従って、我々の分離成績も考え合わせ、Coxsackie B 3型は55年夏から初冬にかけて東北、北海道などで流行し、echo 3型は同年夏、全国的に流行したが、札幌市では初冬まで流行が続いたものと思われる。Coxsackie B 3型やecho 3型の感染が冬期間も起っている事実はその流行形態を考える上でも興味深い。

冬期間はやはり腸管系ウイルスの分離頻度が低く、2月の厳冬期には殆ど分離されていないが1月～3月にかけてecho 25型が毎月分離されている。これは他の時期にも下水中に存在していながら、冬期間、他のウイルスが少なくなったため初めて分離されたものか、あるいはこの時期に限って流行したものが問題となろう。全国的には殆ど夏期にのみ分離されており、前者の可能性が大きいと思われる。

Poliovirusの分離頻度を型別にみると2型および3型に比して1型が低い。これは鼻咽腔からの分離は1型が多いにもかかわらず、便材料、下水あるいは河川から分離される1型ウイルスは2型あるいは3型よりはるかに少ないという報告^{2,3,8)}に一致しており全国的に共通な現象と考えられる。最近用いられているポリオ生ワクチンでは1型ウイルスに対する接種後の抗体上昇が他型より悪いと報告されており⁹⁾、これらの事実を総合すると1型ワクチン株はヒト腸管系での増殖が他型に比べ悪い可能性も考えられよう。

7月に分離されたpolio 3型、2型ウイルスについてはこれがワクチン株か否かを確認する目的でそのメーカーの検討が必要であろう。

最近、海外から持ち込まれたと思われる野生株が国

内で分離されており⁹⁾、一方でポリオワクチン接種率も近年低下している¹⁰⁾ことから、ポリオのサーベイランスは今後なお重要な課題である。

RD細胞はCoxsackie A型ウイルスに対する感受性が高くA 16型ウイルスも分離可能¹¹⁾と言われているが、本検索ではCoxsackie A型ウイルスを分離することはできなかった。この理由として札幌市で同ウイルスの流行がなかった可能性の他、RD細胞の同ウイルスに対する感受性がこれまでいわれていた程高くない可能性が考えられる。Coxsackie A型ウイルスの分離にはやはり乳のみマウスが必要との報告¹²⁾もあり、この点は更に検討が必要であろう。また、その他の理由として、分離精製の方法が不適當であった可能性、下水中に混在する他のウイルスがより多く増えたため同定できなかった可能性、および未同定ウイルスがCoxsackie A 16 virusである可能性(schmidt pool血清, Melnick pool血清中に抗Coxsackie A 16型ウイルス抗血清は含まれていない)等が考えられ、これらの点も検討が必要であろう。なお、RD細胞はecho virusに対する感受性がHeLa細胞より高く、この点では有用であると思われる。

下水中のウイルスは大部分が汚泥に吸着した形で存在するとの報告¹³⁾から、我々は下水からのウイルス分離における汚泥、初沈汚泥の重要性を考慮して、ウイルスをこれから解離させる目的でpH(9.4-9.6)、超音波処理を行い分離を試みたが成績に示したごとく初沈汚泥からのウイルス分離は生下水より悪く、かつ生下水の上清と沈澱を比べてもウイルス分離成績に著明な差は認められなかった。処理に手数のかかる生下水中の汚泥、初沈汚泥を用いても、このようにウイルス分離成績が向上しないことから、今後は処理の最も簡単な生下水上清を用いれば充分であろう。

今回は放流水からのウイルス分離は陰性であったがFujiwara *et al.*¹⁴⁾の帯広市での調査では放流水からもウイルスが分離されており、下水処理過程におけるウイルス対策も今後の課題であろう。

伝染病予防法に定められた所謂法定伝染病、届出伝染病やその他に定められた感染性疾患については診断した医師が保健所などに届出ることになっており、その流行実態は(少なくとも発病したものについては)正確に把握される筈であるが、実際には届出義務が厳格に遵守されているとは言えず、特に届出伝染病の届出率は10%以下とも言われていて、その流行を正確につかみえないのが実態であった。また、流行する感染症そのものも上述の法律制定時と比べ大きく変わってき

ており現実に即さない点もでてきた。このため、現在、全国の選ばれた医療機関を定点として厚生省による感染症サーベイランス事業が実施されている⁸⁾。しかし、腸管系ウイルス感染症は不顕性に終ることが多く、病院、診療所などを定点としたサーベイランスでは、不顕性感染を含めた流行の実態を把握することは困難である。従って、都市下水のウイルス学的検索により、下水排出地域住民の腸管系ウイルス流行を不顕性感染を含めて把握できるなら、サーベイランスに役立つと思われるが、本報で示したように、札幌市における下水からのウイルス分離結果が、全国の主に臨床材料からのウイルス分離結果と比較的よく一致していて、実際の流行をある程度反映していると考えられること、また、岩崎ら⁹⁾が報告しているように東京都での下水からのウイルス分離結果が小児における腸管系ウイルス感染症の流行実態をよく反映していることなどから、下水からのウイルス分離はサーベイランスの一手段として有用と思われる。

しかし、このようにして得られたウイルス分離結果の解釈に当っては、ウイルス分離に用いられた検体がヒトから直接得られた物でなく、下水道施設を経て得られたものであることに注意が必要であることは言うまでもない。下水中にはヒトの糞便以外に様々な物質が混入しており、動物の尿尿なども混入している可能性が大きい²⁾。従って、今回、我々の分離した reovirus が動物由来である可能性も否定しえない。また、下水中のウイルス生存期間が季節により、どのように変化するか、降水量により、分離率がどのような影響を受けるか、工場排水などによるウイルスの不活化がどれ位あるかなどについて今後、検討が必要であろう。その他、下水中に2種以上のウイルスが同時に存在する場合、培養細胞での増殖能の違い、あるいはウイルスによる干渉などにより、特定のウイルスのみが分離され、他のウイルスの流行を把握しえない可能性もある。

以上、述べたような点に注意が必要ではあるが、下水のウイルス学的検索は患者等を対象にしたサーベイランスと共に実施されれば腸管系ウイルスの流行把握に大きく役立つものと思われる。

5 結 語

札幌市白石区の下水処理場から、昭和55年7月から56年7月にかけて毎月下水を採取し、HeLa細胞、RD細胞を用いて、そのウイルス学的検索を行った。以下に主な結果を述べる。

1. 昭和55年夏～初冬にかけCoxsackie B3型ウ

イルス、echo 3型ウイルスなどが多数分離され、特にCoxsackie B3型ウイルスは秋以後も夏同様度々、分離された。

2. Poliovirusは生ワクチン投与時期に対応して春、秋に2型、3型が多数分離された。

3. 冬期間、下水からのウイルス分離頻度は低下するが、56年1月～3月にかけてecho 25型ウイルスが毎月分離された。

4. 下水からのウイルス分離結果は全国の主に患者材料からのウイルス分離結果と比較的よく一致しており、下水からの定期的ウイルス分離が腸管系ウイルスサーベイランスの一手段として有用である可能性が示唆された。

研究協力者：後藤良一，田中千春，中田智明，山下敏彦，吉武英子（昭和55，56年度本学第4学年学生）

謝 辞

Schmidt pool 血清を分与していただきました国立予防衛生研究所原 稔博士に感謝致します。

文 献

1. 岩崎謙二，藪内清，矢野一好，柴田タツ美：下水からのウイルス分離。臨床とウイルス 6, 55-59 (1978)。
2. 松浦久美子，長谷川澄代，中山喬，森田修行：富山市内河川水のウイルス汚染に関する定点観測。第28回日本ウイルス学会総会演説抄録 1037 (1980)。
3. 川原真，後藤則子，太箸全孝，土平一義：河川水及び下水のウイルス学的検索。第28回日本ウイルス学会総会演説抄録 1036 (1980)。
4. Wellings, F., Lewis, A., Mouttain, C.: Demonstration of solids-associated virus in waste water and sludge. Appl. Environ. Microbiol. 31, 354-358 (1976)。
5. Schmidt, N. J., Gnether, R. W., Lennette, E. H.: Typing of ECHO virus isolates by immune serum pools. The "Intersecting serum scheme". J. Immunol. 87, 623-626 (1961)。
6. 多ヶ谷勇：エンテロウイルス，日本公衆衛生協会編集：ウイルス・リケッチア検査 第2版，263-278 (1978)。
7. Lim, K., Benyesh-Melnick, M.: Typing of Viruses by combination of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and echo). J. Immunol. 84, 309-317 (1960)。
8. 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報。第1号-第17号 (1980-1981)。
9. 原稔，萩原昭夫，米山徹夫，斉藤芳子，下条寛人：

- 抗原的に非ワクチン様をしたポリオ1型ウイルスの血清学的, 生化学的解析. 第30回日本ウイルス学会総会演説抄録 3019 (1982).
10. 北海道衛生部保健予防課資料 (1980-1981).
11. 浦沢价子, 浦沢正三: 組織培養によるエンテロウイルスの分離と最近の知見. 組織培養 **5**, 93-102(1979).
12. 栄賢司, 石原佑式, 西尾治, 鷺見順子, 藤原明, 三宅恭司, 井上裕正: RD細胞に対するコクサッキー-A群ウイルスの感受性. 第30回日本ウイルス学会総会演説抄録 3020 (1982).
13. 矢野一好, 林志直, 柴田タツ美, 藪内清, 岩崎謙二: 下水汚泥を用いたウイルス吸着と溶出実験. 第28回日本ウイルス学会総会演説抄録 3017 (1980).
14. Fujiwara, S., Shinagawa, S., Sato, G., Urasawa, S., and Urasawa, T.: Isolation of Virus from sewages and sludges in a sewage treatment plant in northern part of Japan. Res. Bull. Obihiro Univ. in press.
-

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学衛生学講座 浦沢价子